

<i>Peperomia caperata</i>	豆瓣绿属	<i>Limnophilia chinensis</i>	中华石龙尾
<i>P. longifolia</i>		<i>Linaria vulgaris</i>	柳穿鱼
<i>Piper nigrum</i>	胡椒属	<i>Mazus pumilus</i>	
Plumbaginaceae	白花丹科	<i>Torenia fournieri</i>	兰猪耳
<i>Plumbago indica</i>	印度蓝茉莉	<i>Verbascum thapsus</i>	毒鱼草
Polemoniaceae	花荵科	Solanaceae	茄科
<i>Phlox drummondii</i>	福禄考	<i>Petunia x hybrida</i>	矮牵牛杂种
<i>P. paniculata</i>	天蓝绣球	<i>P. inflata</i>	膨大矮牵牛
<i>P. subulata</i>	丛生福禄考	<i>P. parodii</i>	
Portulacaceae	马齿苋科	<i>P. parviflora</i>	
<i>Portulaca gorandiflora</i>	半枝莲	<i>Physalia peruviana</i>	灯笼果
Ranunculaceae	毛茛科	<i>Salpiglossis sinuata</i>	
<i>Anemone coronaria</i>	罂粟秋牡丹	<i>Solanum dulcamara</i>	千年不烂心
<i>Clematis montana</i>	山铁线莲	<i>S. nigrum</i>	龙葵
<i>Nigella sativa</i>	家黑种草	本名录参考书为:	
Rosaceae	蔷薇科	B.V.Conger (Editor), 1981; Cloning	
<i>Rosa hybrida</i>	月季	Agricultural Plants Via in Vitro Te-	
R.SP.	蔷薇属一种	chniques. CRC. Press, Inc. Boca, Raton,	
Saxifragaceae sp.	虎耳草科一种	Florida. P. 23-33.	
Scrophulariaceae	玄参科	以上名录中的植物其具体文献, 在该书中有文	
<i>Antirrhinum majus</i>	金鱼草	献目录, 可以查找。	

植物原生质体培养与遗传操作

何若天

(广西农学院)

一、植物原生质体培养和细胞融合的一些进展

1960年, E. C. Cocking用酶法从高等植物细胞中分离得原生质体, 为高效地从高等植物中分离原生质体打开了局面。迄今已能从几乎所有的植物薄壁细胞中分离得生活的原生质体, 并对种类日渐增多的植物原生质体进行培养。据不完全统计, 迄今世上已能使近百种植物由原生质体培养成植株。在我国, 除早年已由胡萝卜、菸草和矮牵牛等原生质体再生植株外, 近年对园艺、药用、经济植物和禾谷类植物的十个科约24种植物, 用原生质体培养物再生了植株, 例如, 蔬菜植物中有蕃茄、结球甘蓝、油菜、黄瓜、莴苣、洋葱、茄子、马铃薯等; 药用植物有川芎、洋地黄、怀地黄、当归、黄果蕃茄、龙葵等; 经济植物有黄花菸草、长花菸草、粉蓝菸草等, 豆

科植物有胡芦巴、紫花苜蓿、三叶草等,尤应指出的是中国科学院遗传研究所最近已继日本之后,第二个首批把水稻原生质体培养成植株,目前已获得20多株幼苗,上海植物生理研究所亦使水稻和棒头草(*Polypogon fugax* Neesex Steud)的原生质体再生植株,来自台糖134的花粉植株产生的细胞悬浮物原生质体已获得分化出根的愈伤组织。此外,尚有许多其他植物的原生质体虽未成植株,但有的已培养成愈伤组织。在水生漂浮植物和藻类等原生质体的分离和培养研究方面亦获可喜成果。

在细胞融合方面,自1972年P. S. Calson等首次获得第一个菸草种间体细胞杂种以来,迄今国内外已有50多个杂交组合获得了种内、种间、属间乃至科间的体细胞“杂种”植株或细胞系。其中包括有核“杂种”和胞质杂种。但获得的所谓“杂种”植株,大都属于茄科植物,尤其是菸草属植物。此外,在马铃薯+蕃茄、羊角芹+胡萝卜、拟南芥+野油菜、毛蔓陀罗+颠茄、甘蓝+野油菜、栽培苜蓿+镰形苜蓿、碧冬茄+帕罗蒂碧冬茄等种间或属间体细胞杂交中也获“杂种”植株,还有人把固氮蓝绿藻掺入菸草原生质体内。现在,细胞融合研究已朝着将除莠剂抗性和胞质雄性不育等细胞质基因导入同一个体的方向发展。

近年来,细胞融合技术已有很大发展。最早用 NaNO_3 诱导原生质体融合,融合率很低;A. Keller和G. Melchers(1973)改用高PH(9.5—10.0)和高钙(0.05M CaCl_2)法,融合率有所提高;接着,高国楠(K. N. Kao)等(1974)发现聚乙二醇(PEG)能诱导原生质体融合,如再结合高pH和高钙法,融合率可大大提高至10~35%。迄今,许多植物体细胞“杂种”几乎都是用此法诱融而得的。上述方法均属化学诱融法,近年着手建立物理方法,最早是1979年日本的Mitsugi Senda等借用两个与电刺激器连接的显微电极尖端使两个已粘着的原生质体融合成功。接着,西德的U. Zimmermann等(1980)设计了一种由两个平行电极组成的双向电泳融合室,用高压脉冲使融合室内同种或异种植物的大量原生质体在短时间内发生高频率融合(可达50—80%)。

二、遗传转化

遗传转化是指把外源基因或DNA片段转移到另一细胞的染色体内,使细胞发生某些遗传变异。使外源基因进入植物细胞,一般通过两种途径:第一种是利用原生质体以胞饮方式摄取外源DNA、染色体、胞核、质体或线粒体等,或用微量注射法注入原生质体内,例如山田康之等人用此法把与黄连素结合的DNA注入大戟原生质体内,荧光测定表明大戟细胞核内具有作为标记物的黄连素的黄色荧光,但此种直接摄入或注入的DNA往往在几小时内便被降解或丧失。故至今尚无以这种方式进入原生质体的遗传物质能表达的证据。另一法是用原生质体融合法,例如Evans等人将菸草属*Nicotiana glauca*和*N. glauca*两个野生种与普通菸草作细胞融合,从融合杂种细胞再生的植株表现有来自野生种抗菸草花叶病毒(TMV)的抗性。日本的内宫将普通菸草与心叶烟草的原生质体融合,也获具有抗TMV性能的杂种。但这些种间杂种亲缘关系虽近,仍表现严重的遗传不稳定性,多数不孕。因此至今尚难确定细胞融合是否能作为有用核基因掺入的有效方法。目前有证据表明原生质体融合可产生胞质杂种。菸草属和甘蔗属原生质体融合试验揭示了原生质体能重组,但没有叶绿体基因组重组的证据,因为这种重组不稳定,且后代很快分离。不过,胞质杂种对细胞质基因转移非常有

用。这些胞质基因包括有雄性不孕系基因、控制光合与呼吸的基因、抗除莠剂基因等。最近日本味之素公司的研究者原先用的生产赖氨酸的短杆菌(*Brevibacterium SP.*)虽然产量较高,但菌株本身生长速度慢。为此,他们选择了一种生长速度快的其它菌株和它进行细胞融合,结果获得了一株赖氨酸产量高、生长速度快的新菌种,其赖氨酸生产速率为原用菌的三倍。

遗传转化的第二种途径是通过合适载体把外源基因引入植物细胞。受到普遍重视的有两种载体系统:一是用植物病毒DNA/RNA作为载体系统,最常用的是花椰菜花叶病毒(*Cauliflower mosaic virus*,缩写CaMV),最近发现雀麦草花叶病毒(BMV——一种RNA病毒)亦可作为基因载体;另一种是利用致瘤农杆菌(或称根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*)所含能诱导双子叶植物长瘤的质粒(Tumor-inducing Plasmid,简称Ti质粒)为载体。利用病毒为基因载体有三缺陷:一是病毒能致病;二是病毒繁殖力差,不易精制;三是能运载的外源DNA量有限,且宿主范围太窄。故以Ti质粒为载体较受重视。大量研究已证明Ti质粒的一部分DNA(称为T区的DNA,即T-DNA)能被整合到双子叶植物瘤细胞的染色体上。此外,还有一种更为广谱的载体是脂质体(Liposome),它是用磷脂调制的人工小囊,可把外源低分子量DNA包裹起来,但包入率低,约为10%,对高分子量DNA包裹很困难。过去常用完整组织或器官作受体,但因胞壁限制,实验操作较难。后用无壁原生质体为受体可解决此困难,而且Ti质粒载体可无需经过细菌感染途径进入植物细胞。例如有人用矮牵牛的原生质体分别和五种致瘤农杆菌共培养,选择出的转化细胞系具有生长激素自主和合成胭脂碱之能力。最近,美国华盛顿大学的研究者把去掉了一端编码病毒本身外壳蛋白的序列的DNA片段插入致瘤农杆菌的Ti质粒T区中,然后把这种重组后的病毒DNA转移到菸草和蕃茄原生质体上,转化细胞再生植株后,经大量致病性TMV感染,结果表明有150个转化植株均延迟出现感染症状,其中有些植株完全没有表现感染症状,从而有可能获得抗病毒植株。

三、体细胞无性系的筛选

亲本体细胞无性繁殖所产生的无性系,其基因组像有性繁殖体的基因组一样,能产生变异,这些变异可为育种工作者改良植物品种提供一个可选择的源泉。最近,Karkin和Scowcroft等的工作表明,以小麦为材料已获得在形态特征(包括株高、粒色、芒的有无等)和生化特征均有差异的无性繁殖系突变体。在许多种植物如甘蔗、水稻、马铃薯、菸草、燕麦、玉米、大麦、高粱、苜蓿、香石竹、胡萝卜、凤梨、莴苣、大蒜、天竹葵和芸苔属等,及各种来源的愈伤组织、悬浮培养细胞、原生质体等都观察到有体细胞变异现象。60年代初,甘蔗经组织培养结合感染处理,已选育出抗斐济病、抗霜霉病和抗杆黑粉病等甘蔗无性系。水稻通过组培亦选育出矮秆耐低温的变异体。

原生质体是个纯粹的单细胞,因此,以原生质体为培养材料所产生的无性系变异体在作物改良中可能有更大作用。1973年,美国的Shepard等在未作任何诱变处理的菸草叶肉原生质体再生的无性系群体中,发现有约250个再生植株中有一株叶片上会出现杂色斑点。这种特性能通过有性杂交传到子代。嗣后,他们发现马铃薯Russet burbank品系的叶肉原生质体产生的大多数植株不仅与亲本不同,且彼此间也很不相同。在这些无性系中有许多变异,

大致可分为两类：一类为野生型的畸形体，染色体数已有改变；另一类为表现型变异体，它们个体间的差异微小，染色体数不变或仅有细微差别。变异也表现在改变了对致病有机体的敏感性上。例如有些变异体对马铃薯早疫病的致病菌不如亲本那样敏感。又如约有2%原生质体无性系对马铃薯晚疫病的抗性高于亲本。其后代仍能保持着它们的抗性水平。他们从 Russet burbank 品系的马铃薯叶肉原生质体无性系中选出65个作了检验，被测定的复杂性状几乎全部存在着表型的变异，没有一个是彼此相似或是亲本的复制品。园艺性状（如生长习性，成熟期、块茎大小及形状、光周期反应等）和在遗传上最复杂的特性如块茎产量等也发生了变异。

可见、利用原生质体无性繁殖系所产生的变异体是条有希望的作物育种新途径。产生无性繁殖系变异的主要原因目前还不清楚，据某些研究表明，很重要的一个原因是培养过程中产生非整倍体和染色体重排；此外，基因的扩增和减少、基因转化、体细胞重组、转座因子的运动以及由于易位和染色体重排所产生的位置效应突变也会导致变异。还有一种可能是产生细胞培养物的原植物中原来就存在的自然变异。

四、利用原生质体进行诱变

通过化学的或物理的诱变方法可扩大变异幅度和提高变异率。跟多细胞组织或器官相比利用原生质体为材料作诱变处理，具有数量大、诱变率高、可选择机率大的优点。

Ohyama等（1974）将分离自大豆悬浮培养细胞的原生质体用5-溴去氧尿嘧啶处理，获得能耐5-溴去氧尿嘧啶的突变体。Bright等（1974）从小无花果树原生质体中也获得抗5-溴去氧尿嘧啶的突变型细胞系。

Carlson（1973）用单倍体菸草作材料，经化学诱变，获得抗甲硫氨酸的菸草植株。这在抗病育种中很有实用价值。因为引起菸草患野火病的正是病原菌 *Pseudomonas tabaci* 产生的毒素甲硫氨酸的类似物。因此，有可能用类似方法育出抗野火病的菸草。

最近，大野清春等（1985）把品种为“日本晴”的水稻种子产生的愈伤组织置于NaCl浓度渐增的培养基上继代培养，不断对存活的愈伤组织进行筛选。对其中经培养了49个月的一块适应性基本稳定的愈伤组织分离出原生质体并进行培养，把所获得的来自原生质体的细胞团中分离出的少数细胞团在含NaCl培养基上再行继代。结果从中获得4个能在浓度15g/l和25g/l的NaCl培养基中均能生长的愈伤组织。这表明，通过对原生质体作诱变培养，选育耐盐的水稻细胞并再生成完整耐盐植株是可能的。

可见近几年来植物原生质体培养和体细胞融合工作已有很大进展，尤其是禾谷类作物如水稻原生质体能培养再生植株是个很大的突破。

在原生质体培养和细胞融合方面，迄今尚存在不少困难。例如，许多重要谷类作物和经济作物如小麦、玉米、大豆、棉花、甘蔗等原生质体尚未能再生完整植株，所得许多体细胞“杂种”主要局限在茄科植物中，而且现已获得的许多“杂种”具有诸如异倍性、不育性、畸形、生育迟缓等一类不符合育种要求的性状，有性杂交不亲和现象在体细胞融合中亦有表现，等等。此外，还有一大缺陷是基础研究不足，例如原生质体游离后所发生的细胞学、生理生化等变化，细胞融合机理，融合细胞的超微结构、遗传特性、生理生化变化等又是如

何?迄今知之甚少或一无所知。

五、在广西建立原生质体培养和有关遗传 操作技术的可能与研究方向的商榷

我区植物组织培养工作开展较早,并取得了不少成绩,在花药培养(单倍体育种)及某些重要经济作物和花卉等无性快速繁殖工作中均有出色成果。植物原生质体培养和细胞融合工作开展较晚,在区科委支持下,也开展了一些工作,并已有一些基础,对甘蔗、水稻、苧麻、罗汉果、马尾松、杉木、橡胶等十多个重要作物进行了原生质体分离和培养。其中从田间栽培的甘蔗茎尖分离的原生质体培养时能细胞分裂,有的形成了小细胞团。马尾松胚轴原生质体能再生胞壁。对某些植物原生质体作了些融合工作,结合原生质体分离和培养开展了一些生理生化方面的基础研究。为我区进一步开展有关工作建立了初步基础。目前存在问题是设备不足,人力缺乏,从事有关工作的人员负有繁重教学任务,时间上难以保证,工作进展很慢。为使这一工作不致中途夭折而能得到一定发展,我们提出如下初步建议:

1.加强人才培养,建立相对稳定的专职队伍 科技要发展,人才是关键。近年来,我区从事细胞工程已有丰富经验而又有突出成绩的人员大都外流了,但没有补员。至于专一从事原生质体工作的实际仅有一人在坚持。如再不切实解决人才培养和建设一个相对稳定的专职队伍,我区的细胞工程工作恐有垮台之虞。

2.切实加强研究基地的建设。 据我区现有状况和条件,不宜另建研究基地,而应加强现有基地,即广西农学院、广西农业科学研究所、广西植物研究所、广西林业科学研究所和广西药用植物园等五大组培室。对广西师范大学生物系建立的细胞生物学研究也应予以重视。设法聘任一些专业人员,在现有设备和人力等方面作适当调整和集中,打破人才和设备的单位所有制。

3.莫急功近利,应既考虑当前我区经济建设需要,又要顾及长远发展,重视基础研究

现有一股风,一切科技工作都首先考虑能否在很短时间内取得经济效益,最好是“吹糠见米”。当然,这是需要的,但也要作些长远考虑,尤其是原生质体工程不是短期内能奏效的,但从长远考虑,它具有广阔前途。其他基础研究工作也是如此。因此,建议有关高等院校可侧重基础研究和探索性研究,农业研究单位则侧重应用研究,彼此分工协作,才利于加快工作进展。

4.我区原生质体培养和细胞融合研究重点应放在那里? 鉴于微生物在医药、农业、食品工业、发酵工业和化学工业等领域中有重要作用,而且微生物细胞周期短,较易培养。开展有重要价值的微生物(如食用菌和工程菌)细胞融合研究,以图培育新微生物品种可能有较大经济价值。我们是否以此为重点?此外,对我区某些特有的重要经济作物进行原生质体培养,结合诱变,筛选一些农艺性状更优的变异植株亦应作为研究方向。